

PENENTUAN LOKUS GEN DALAM KROMOSOM TANAMAN DENGAN BANTUAN MARKA DNA

Determination of Gene Locus in Plant Chromosomes with DNA Marker

Reflinur dan Puji Lestari

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111, Indonesia
Telp. (0251) 8337975, 8339793, Faks. (0251) 8338820
E-mail: reflinur@yahoo.com, bb-biogen@litbang.pertanian.go.id

Diterima: 6 Juli 2015; Direvisi: 19 Oktober 2015; Disetujui: 29 Oktober 2015

ABSTRAK

Kemajuan teknik marka molekuler memberikan kemudahan bagi pemulia tanaman dalam penentuan lokasi gen yang mengendalikan karakter yang diinginkan. Penentuan gen yang mengendalikan sejumlah karakter penting dengan menggunakan marka genetik telah berhasil dilakukan pada berbagai jenis tanaman. Sebelum pemetaan suatu marka molekuler terhadap karakter yang diinginkan, diperlukan pemetaan genetik yang dikonstruksi dari sejumlah marka molekuler. Pemetaan daerah dalam kromosom yang mengendalikan karakter kualitatif dan kuantitatif mendapat perhatian yang sangat besar dalam program pemuliaan. Penentuan gen yang mengendalikan karakter kualitatif maupun kuantitatif memerlukan populasi pemetaan. Metode umum yang digunakan dalam penentuan lokasi gen yang mengendalikan karakter kualitatif ialah *bulk segregant analysis* (BSA). Pendekatan tersebut terbukti mampu mempercepat penentuan lokasi gen dengan biaya yang relatif rendah. Sebaliknya, penentuan lokasi gen yang mengendalikan sifat kuantitatif dilakukan melalui pemetaan *quantitative trait loci* (QTL). Dibandingkan penentuan lokasi gen pengendali sifat kualitatif, pemetaan QTL lebih kompleks dan membutuhkan kemampuan analisis statistik untuk menentukan daerah kromosom yang terkait dengan karakter kuantitatif tersebut. Tulisan ini membahas metode penentuan lokasi gen di dalam kromosom yang bertanggung jawab terhadap karakter penting tanaman dengan memanfaatkan marka molekuler dalam pemetaan genetik dan analisis QTL.

Kata kunci: Gen, lokus, marka molekuler, kromosom, karakter kualitatif, karakter kuantitatif

ABSTRACT

Advance in molecular marker techniques has facilitated breeders in tagging of genes conferring desirable traits. Tagging of genes controlling a large number of economically important traits using genetic markers has been successfully applied in various crops. Before a molecular marker linked to a gene in a chromosome can be mapped, a genetic linkage map constructed from molecular markers is necessary. Tagging of chromosomal regions affecting qualitative and quantitative traits received growing attention in plant breeding program. Tagging of genes controlling both

qualitative and quantitative traits required mapping populations. Bulk segregant analysis (BSA) is the usual method in locating genes controlling qualitative traits. BSA approach has proved a fast method for tagging genes controlling qualitative traits with relatively cheap cost. On the other hand, tagging of genes responsible for quantitative traits has been carried out through quantitative trait loci (QTLs) mapping approach. Compared to qualitative gene tagging, gene tagging for quantitative traits is more complicated and required powerful statistical method to specify chromosomal location linked to traits. In details, the method for tagging genes for important traits was discussed in this article, particularly, molecular marker application in genetic mapping and QTL analysis.

Keywords: Genes, locus, molecular markers, chromosomes, qualitative traits, quantitative traits

PENDAHULUAN

Penentuan lokus suatu gen dalam kromosom secara konvensional maupun dengan bioteknologi merupakan kegiatan yang dilakukan oleh pemulia tanaman untuk meningkatkan mutu suatu varietas tanaman. Kegiatan ini membutuhkan peta genetik yang dikonstruksi berdasarkan marka molekuler, yang dapat dikelompokkan menjadi marka klasik dan marka DNA. Marka klasik meliputi marka morfologi, sitologi, dan biokimia. Marka genetik umumnya dimanfaatkan dalam kegiatan karakterisasi plasma nutfah, isolasi suatu gen, seleksi alel target yang terintrogressi pada suatu individu, dan perlindungan varietas (Henry 2001).

Marka morfologi memiliki kelemahan, terutama jumlahnya sangat terbatas, tingkat polimorfismenya rendah, dan dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Meskipun dalam praktik marka morfologi lebih mudah dimonitor, beberapa marka morfologi, seperti warna bunga, biasanya muncul lebih lambat sehingga skoring tidak dapat dilakukan lebih awal (Poehlman dan Sleper 1995). Penggunaan marka sitologi dalam pembentukan peta genetik biasanya berbasis tampilan struktur kromosom. Marka sitologi jarang digunakan dalam pemetaan genetik

karena memerlukan bantuan teknik molekuler. Marka biokimia seperti isozim memiliki tingkat polimorfisme yang tinggi, tetapi jumlah marka ini sangat terbatas dan dipengaruhi oleh fase pertumbuhan tanaman.

Marka DNA lebih disukai dibanding marka genetik lainnya karena tingkat polimorfismenya sangat tinggi, jumlahnya banyak, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, analisis sampel dapat dilakukan pada stadia awal pertumbuhan tanaman, dan tingkat heritabilitasnya 100%. Berdasarkan metode deteksinya, marka DNA dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu marka DNA berbasis teknik hibridisasi, *polymerase chain reaction* (PCR), dan berbasis sekuen DNA atau sekuensing DNA (Jones *et al.* 1997; Gupta *et al.* 2002).

Kemajuan yang pesat dalam bidang teknologi marka DNA dapat mengatasi keterbatasan yang selama ini ditemui pada marka morfologi, sitologi, dan biokimia. Melalui penggunaan marka DNA, pencapaian tujuan suatu program penelitian untuk penelitian dasar maupun penelitian yang bersifat aplikatif dapat dipercepat dan dipermudah. Pada penelitian dasar, penggunaan marka DNA lebih diarahkan sebagai alat bantu dalam analisis hubungan kekerabatan antarindividu (analisis filogenetik) dan pencarian gen-gen potensial pada suatu spesies dalam rangka perbaikan sifat atau karakter suatu individu tanaman. Pada penelitian yang bersifat aplikatif, marka DNA antara lain digunakan sebagai alat bantu dalam kegiatan seleksi tanaman (*marker assisted selection*/MAS), penelusuran hubungan darah antara orang tua dan anak, serta sebagai alat bantu bagi pihak yang berwenang dalam kegiatan inspeksi dan sertifikasi suatu produk makanan ataupun identitas varietas. Dengan dipetakan-nya letak suatu gen dalam kromosom, seleksi suatu karakter yang diinginkan dengan tingkat presisi, akurasi, dan efisiensi seleksi yang tinggi dapat dilakukan dengan cepat. Hal ini akan mempercepat program pengembangan varietas baru. Tujuan dari tulisan ini adalah untuk mengulas penentuan lokus suatu gen pada kromosom tanaman menggunakan bantuan marka molekuler.

KONSTRUKSI PETA GENETIK

Peta genetik (*linkage maps*) menunjukkan posisi dan jarak genetik relatif antara marka-marka DNA di sepanjang kromosom suatu spesies (Paterson 1996; Collard *et al.* 2005). Susunan dan urutan suatu marka dan jarak genetik relatif marka-marka tersebut ditentukan berdasarkan nilai rekombinasi dari pasangan marka yang digunakan sehingga terbentuk grup-grup keterpautan. Pada prinsipnya, susunan atau urutan marka dalam suatu peta keterpautan dihitung berdasarkan konsep segregasi dan rekombinasi, seperti yang dipaparkan dalam teori pewarisan pada hukum Mendel (Paterson 1996).

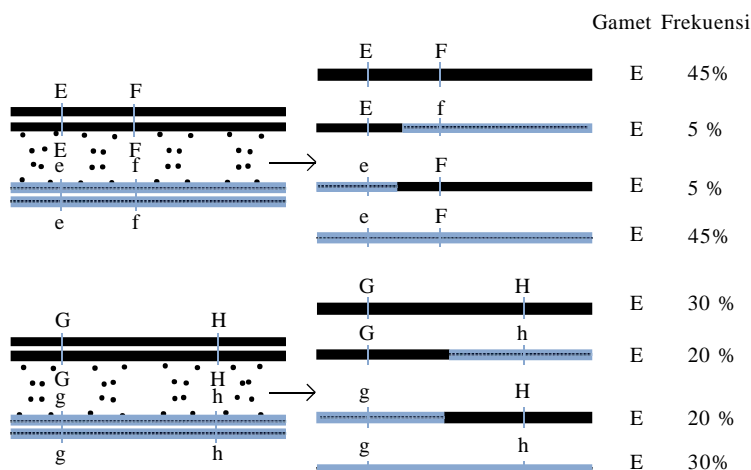
Ketersediaan peta genetik dengan tingkat resolusi tinggi akan mempermudah penentuan lokus suatu gen dalam kromosom, jumlah gen, dan kekuatan gen yang

bertanggung jawab terhadap karakter tertentu. Gen yang bertanggung jawab terhadap karakter kualitatif maupun kuantitatif dikenal sebagai *quantitative trait loci* (QTLs) (Mohan *et al.* 1997; Doerge 2002; Yim *et al.* 2002). Makin banyak jumlah marka DNA yang digunakan dalam analisis segregasi, peluang untuk mendapatkan peta genetik yang lebih lengkap akan makin tinggi.

Peta genetik juga dapat memfasilitasi pemulia tanaman dalam mengintrogresikan gen atau QTLs yang diinginkan melalui program MAS dan membantu para peneliti dalam studi komparatif kemiripan susunan dan fungsi suatu gen dalam mengekspresikan fenotipe dari spesies-spesies yang berbeda (Ahn dan Tanksley 1993; Paterson *et al.* 2000). Bahkan, ketersediaan peta genetik menjadi dasar dalam kloning suatu gen yang bertanggung jawab terhadap karakter yang memiliki nilai ekonomis tinggi atau yang dikenal sebagai *positional or map-based cloning* (Mohan *et al.* 1997). Dalam pembentukan peta genetik, metode dan teknik yang digunakan harus sederhana, tetapi tingkat akurasi tinggi, mudah diadopsi oleh pengguna, cepat dalam pengerjaannya, dan efektif dalam biayanya.

Pada dasarnya pemetaan genetik didasarkan pada prinsip bahwa gen (marka atau lokus) bersegregasi melalui rekombinasi kromosom selama proses meiosis sehingga memungkinkan para pemulia melakukan analisis segregasi gen tersebut pada individu-individu turunannya (Paterson 1996). Gen atau marka DNA yang saling berdekatan (*tightly-linked markers*) diwariskan secara bersama-sama dari tetua kepada progeninya dengan frekuensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan gen atau marka yang letaknya berjauhan satu dengan lainnya (Gambar 1). Pada suatu populasi yang bersegregasi, genotipe tetua maupun genotipe heterozigot (rekombinan) akan diwariskan pada generasi berikutnya sebagai hasil persilangan dari kedua tetua. Dengan demikian dapat dihitung fraksi rekombinasi yang menjadi dasar dalam menghitung jarak genetik di antara marka DNA yang dipetakan. Selanjutnya, nilai fraksi rekombinasi tersebut dikonversi menggunakan suatu fungsi (*mapping function*) ke dalam satuan peta map yang dikenal dengan istilah *centiMorgan* (cM).

Melalui analisis segregasi, urutan marka DNA dan jarak relatif di antara marka-marka tersebut dapat ditentukan. Nilai frekuensi rekombinasi antara dua marka yang makin kecil menunjukkan kedekatan lokasi kedua marka tersebut dalam suatu kromosom. Sebaliknya, makin tinggi frekuensi rekombinasi antara dua marka, makin jauh jarak keduanya pada suatu kromosom. Suatu marka atau gen dikatakan terpaut apabila memiliki nilai frekuensi rekombinasi kurang dari 50% (Hartl 1988). Marka-marka dengan nilai frekuensi rekombinasi 50% dikategorikan sebagai marka yang tidak terpaut satu sama lain. Hal ini diasumsikan bahwa marka-marka tersebut berada pada posisi yang berjauhan dalam kromosom yang sama atau kemungkinan terletak pada kromosom yang berbeda (Hartl dan Jones 2001).



Gambar 1. Skema rekombinasi kromosom homolog selama proses meiosis. Gamet yang terbentuk setelah proses meiosis terdiri atas gamet induk atau tetua (T) dan gamet rekombinan (R). Semakin kecil jarak dua marka, semakin kecil terjadinya rekombinasi di antara kedua marka tersebut. Rekombinasi antara marka G dan H akan lebih sering terjadi dibanding rekombinasi antara marka E dan F. Apabila dilakukan analisis jumlah rekombinasi pada populasi *mapping*, marka E dan F akan terletak pada posisi yang berdekatan dibandingkan marka G dan H (model diadopsi dari Collard *et al.* 2005).

Jumlah marka yang digunakan dalam mengonstruksi peta genetik akan menentukan kelompok pautan yang dapat dikonstruksi. Tersedianya marka DNA dalam jumlah besar dan tersebar pada seluruh kromosom suatu tanaman akan sangat membantu kesuksesan konstruksi peta genetik dengan kerapatan tinggi. Sebaliknya, pembentukan peta genetik dengan jumlah marka DNA yang terbatas menyebabkan peta pautan yang terbentuk rendah.

Di Indonesia, pembentukan peta genetik umumnya dilakukan untuk deteksi dan karakterisasi lokus yang mengendalikan karakter kuantitatif. Beberapa penelitian yang terkait dengan konstruksi peta genetik telah dilaporkan, antara lain pembentukan peta genetik bit gula (Setiawan 2001), jagung (Roberdi *et al.* 2010), kedelai (Tasma *et al.* 2011), dan padi (Lestari *et al.* 2011). Pada pembentukan peta genetik bit gula, 226 lokus *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) telah berhasil dipetakan pada sembilan kromosom (Setiawan 2001). Panjang peta genetik bit gula yang dikonstruksi tersebut adalah 744 cM atau meliputi 70% genom bit gula dengan jarak rata-rata antarmarka 3,1 cM. Roberdi *et al.* (2010) mendapatkan dua kelompok pautan marka SSR yang dikonstruksi dari 175 galur BC₁F₁ hasil persilangan antara jagung kultivar MR-4 x AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B. Kelompok pautan tersebut terdiri atas 12 marka SSR pada kromosom 6 dan 11 penanda SSR pada kromosom 7. Jarak antarmarka SSR yang dipetakan masih tergolong agak jauh dengan kisaran 14,4–37,5 cM. Lebih lanjut, Roberdi *et al.* (2010) melaporkan bahwa terbatasnya jumlah marka yang digunakan dalam konstruksi peta genetik menyebabkan jumlah peta pautan yang dapat dibentuk sedikit. Dalam pemetaan lokus yang terkait dengan karakter tahan bulai pada jagung, Roberdi *et al.* (2010)

menyatakan bahwa untuk mendapatkan peta genetik yang baik, jumlah primer yang tersebar pada seluruh kromosom jagung harus diperbanyak untuk mengisi posisi di antara primer yang telah digunakan pada pembentukan peta pautan sebelumnya.

Tasma *et al.* (2011) berhasil memetakan 119 dari 122 marka SSR pada delapan kromosom kedelai dengan jarak marka berkisar antara 2,2–30 cM dan jarak rata-rata antarmarka yang berdekatan 10,7 cM. Dibandingkan peta pautan marka DNA Roberdi *et al.* (2010), peta pautan yang diperoleh Tasma *et al.* (2011) lebih banyak dan kerapatan pautan marka DNA juga lebih baik. Hal ini karena jumlah marka SSR yang digunakan pada pembentukan peta genetik kedelai lebih banyak dibandingkan dengan yang digunakan pada konstruksi peta genetik jagung. Konstruksi suatu peta genetik memerlukan empat tahapan (Semagn *et al.* 2006), yaitu: 1) pembentukan populasi persilangan atau populasi *mapping* (jenis populasi dan ukuran sampel), 2) penentuan jenis marka DNA yang digunakan dalam *genotyping* populasi *mapping*, 3) skrining tetua untuk menentukan marka yang polimorfis di antara tetua persilangan, dan 4) analisis keterpautan (penghitungan frekuensi rekombinasi di antara marka, pembentukan grup keterpautan, estimasi jarak peta, dan penentuan urutan marka).

PEMILIHAN TETUA DAN JENIS POPULASI

Pemilihan tetua persilangan dalam pengembangan populasi *mapping* menentukan keberhasilan pemetaan gen yang menjadi target dalam pemuliaan tanaman. Tetua-tetua persilangan yang dipilih harus berbeda secara

genetik atau ekstrem pada satu atau lebih karakter target yang telah ditentukan. Sebagai contoh, tetua betina (resipien) dipilih dari kultivar unggul komersial dengan produktivitas tinggi, tetapi tidak memiliki gen ketahanan terhadap suatu penyakit, sementara tetua jantan (donor) dipilih dari kultivar yang memiliki gen ketahanan. Di samping perbedaan yang ekstrem secara genetik, pertimbangan lain yang harus diperhatikan ialah hubungan jarak genetik di antara kedua tetuanya tidak terlalu jauh. Apabila jarak genetiknya terlalu jauh, sterilitas benih yang dihasilkan progeninya menjadi tinggi atau akan mengakibatkan fenomena distorsi atau lebih dikenal sebagai *segregation distortion*.

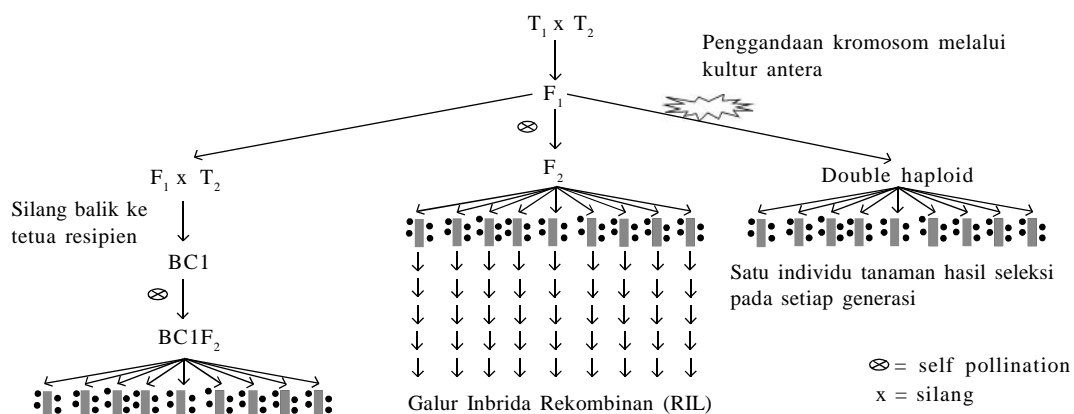
Beberapa populasi *mapping* yang digunakan dalam pembentukan peta genetik dapat dilihat pada Gambar 2. Dalam pemetaan, setiap populasi *mapping* memiliki kelebihan dan kekurangan (McCough dan Doerge 1995; Paterson 1996). Pemilihan jenis populasi persilangan akan menentukan efisiensi dan kesuksesan pembentukan peta keterpautan genetik. Pemilihan jenis dan ukuran populasi *mapping* yang tepat untuk studi pemetaan bergantung pada tujuan penelitian, waktu yang tersedia untuk pengembangan populasi, dan jenis marka DNA yang digunakan (bersifat dominan atau kodominan). Terkait dengan ukuran populasi, belum ada penelitian yang secara spesifik mempelajari ukuran populasi yang paling ideal untuk mendapatkan peta genetik yang akurat. Berdasarkan simulasi, Ferreira *et al.* (2006) yang menggunakan ukuran populasi 50–1.000 individu dari masing-masing populasi F_2 , BC, RILs, dan DH melaporkan jenis dan ukuran populasi *mapping* sangat memengaruhi keakuratan peta genetik yang dihasilkan.

Beberapa penelitian pemetaan genetik telah dilakukan di Indonesia. Meskipun ukuran populasi yang digunakan tidak mencapai jumlah maksimal yang disimulasikan oleh Ferreira *et al.* (2006), namun masih berada dalam kisaran yang telah disimulasikan tersebut. Sanjaya *et al.* (2002) menggunakan 365 individu F_2 dalam membuat peta genetik cabai untuk memetakan karakter ketahanan

terhadap penyakit antraknosa. Selanjutnya Roberdi *et al.* (2010) menggunakan 175 progeni BC_1F_1 hasil silang balik antara tetua MR-4 dan AMATLCOHS-9-1-1-1-1-2-B dalam pembentukan peta genetik jagung tahan penyakit bulai. Tasma *et al.* (2011) menggunakan 100 progeni F_2 kedelai hasil silangan kultivar B3462 dan B3293 untuk mengonstruksi peta keterpautan 125 marka SSR pada delapan kromosom kedelai. Dalam pemetaan gen ketahanan terhadap penyakit blas pada tanaman padi, Lestari *et al.* (2011) membuat peta genetik 112 marka molekuler pada 12 kromosom padi. Ukuran populasi untuk mengonstruksi peta genetik padi adalah 123 galur BC_2F_2 yang dikembangkan dari persilangan antara Way Rarem dan Oryzica Llanos-5.

Ukuran populasi yang terlalu kecil akan menyebabkan terjadinya fragmentasi pada kelompok pautan dan susunan lokus pada peta tidak akurat. Dalam praktiknya, pada studi awal pemetaan genetik, ukuran populasi yang dibutuhkan berkisar antara 50–250 individu (Mohan *et al.* 1997), tetapi untuk membentuk peta genetik yang lebih lengkap (*high resolution mapping*) diperlukan ukuran populasi yang lebih besar.

Marka DNA yang bermanfaat ialah marka DNA yang polimorfis, yaitu yang mampu membedakan kedua tetua persilangan secara genetik. Makin banyak marka DNA polimorfis yang mencakup semua lokasi genom suatu individu, semakin besar peluang untuk mendapatkan peta genetik yang lebih lengkap dan akurat. Marka polimorfis juga dideskripsikan sebagai marka kodominan atau dominan, yakni berdasarkan kemampuan marka tersebut dalam membedakan individu-individu yang homozigot dan heterozigot. Marka kodominan ditunjukkan oleh adanya perbedaan dalam ukuran pita DNA dari satu individu dengan lainnya, sebaliknya marka dominan ditunjukkan oleh ada tidaknya pita dalam ukuran yang sama. Secara sederhana, perbedaan ukuran pita DNA yang terlihat pada suatu gel disebut sebagai alel. Marka kodominan bisa terdiri atas banyak alel yang berbeda, sedangkan marka dominan hanya memiliki dua alel



Gambar 2. Skema pengembangan jenis populasi *mapping* pada tanaman yang menyerbuk sendiri (diadopsi dari Collard *et al.* 2005).

(Collard *et al.* 2005). Di samping ukuran populasi, pemilihan marka DNA (dominan atau kodominan) juga menentukan keakuratan peta genetik. Pada umumnya, peneliti Indonesia memanfaatkan marka DNA kodominan, seperti SSR dalam pemetaan gen target yang mengendalikan suatu karakter penting pada tanaman. Sebagai contoh, Lestari *et al.* (2011) menggunakan 112 marka DNA kodominan yang terdiri atas 110 marka SSR dan dua marka SNP untuk memetakan gen ketahanan terhadap penyakit blas pada tanaman padi. Demikian juga peta genetik yang dibentuk pada penelitian pemetaan gen ketahanan terhadap penyakit bulai pada tanaman jagung (Roberdi *et al.* 2010) dan gen yang bertanggung jawab terhadap karakter toleran cekaman keracunan aluminium pada kedelai (Tasma *et al.* 2011). Menurut Ferreira *et al.* (2006), peta yang dikonstruksi dari populasi RIL dan F₂ dengan menggunakan marka DNA yang bersifat kodominan lebih akurat dibanding menggunakan marka dominan.

Populasi *mapping* F₂ dan silang balik (*backcross*) merupakan jenis populasi yang paling sederhana karena pengembangan populasi ini sangat mudah dan memerlukan waktu relatif cepat dibandingkan dengan jenis populasi lainnya. Namun, kedua jenis populasi ini belum stabil karena komposisi genotipe heterozigot pada individu turunannya masih sangat tinggi dan benih yang diperoleh dari kedua jenis populasi ini belum dapat diperbanyak secara sempurna. Sebaliknya, populasi *mapping* seperti *recombinant inbred lines* (RILs), *near-isogenic lines* (NILs), dan *doubled-haploids* (DHs) bersifat stabil karena homogen dan dikenal sebagai *true-breeding lines* karena individu-individu yang dihasilkan dari populasi ini dapat diperbanyak dan diproduksi tanpa terjadi perubahan genetik. Dalam kegiatan kerja sama antarlaboratorium, biasanya peneliti menggunakan benih yang berasal dari RILs, NILs, dan DHs untuk saling melengkapi peta genetik (Young 1994; He *et al.* 2001). Dalam praktiknya, pengembangan populasi RILs dan NILs membutuhkan waktu lama sehingga menjadi masalah utama dalam pembentukan peta genetik berbasis kedua jenis populasi tersebut. Sebaliknya pengembangan populasi DHs lebih cepat dibandingkan dengan populasi RILs dan NILs, tetapi ketersediaan protokol baku dalam teknik kultur *in vitro* haploid suatu spesies menjadi penentu kesuksesan pengembangan populasi DHs.

PENENTUAN LOKUS GEN PENGENDALI KARAKTER KUALITATIF

Pencarian lokus gen yang mengendalikan sifat kualitatif membutuhkan waktu lebih singkat dibandingkan dengan gen yang mengendalikan karakter kuantitatif karena tidak membutuhkan peta genetik lengkap. Pemetaan gen-gen pengendali karakter kualitatif dapat dipercepat melalui *bulk segregant analysis* (BSA). Teknik ini umumnya

digunakan dalam pemetaan gen-gen yang pola pewarisannya sederhana (kualitatif), namun dapat pula dipakai dalam pemetaan lokus kuantitatif atau QTL major (Wang dan Paterson 1994). Pada teknik BSA, pencarian lokasi spesifik suatu marka DNA dalam kromosom yang terkait dengan sifat tertentu dilakukan dengan mengumpulkan DNA (*bulks* atau *pool*) dari sejumlah individu yang menunjukkan kesamaan fenotipe (Michelmore *et al.* 1991), misalnya dalam penentuan lokus gen pengendali sifat ketahanan terhadap suatu penyakit. Peta genetik dari marka DNA yang berada di sekitar lokus ketahanan dapat ditentukan dari suatu populasi yang bersegregasi dengan cara mem-*pool* DNA (sekitar 10–20 individu) dari individu-individu tahan menjadi satu *bulk* dan individu-individu tidak tahan menjadi satu *bulk*.

Dengan membuat DNA *bulk*, semua lokus pengendali sifat yang ada pada populasi yang diuji, selain lokus yang mengandung daerah target (misalnya gen ketahanan), akan bersifat acak. Dengan menganalisis (*genotyping*) kedua *pool* DNA dengan sejumlah marka DNA polimorfis, akan diperoleh marka DNA yang secara spesifik dapat membedakan kedua *pool* DNA tersebut. Marka polimorfis pada kedua *pool* merupakan marka yang terkait dengan gen target. Marka DNA tersebut pada tahapan berikutnya digunakan untuk *genotyping* semua individu pada populasi yang digunakan dan melokalisasi marka DNA yang terpaut dengan gen target untuk kegiatan *fine mapping* ataupun kloning.

Penelitian terkait dengan penentuan lokus gen pengendali karakter kualitatif belum banyak dilaporkan di Indonesia. Hal ini kemungkinan karena program penelitian dasar belum mendapat perhatian khusus, sebaliknya para peneliti Indonesia lebih banyak memanfaatkan marka DNA yang berasosiasi dengan gen pengendali karakter yang telah dilaporkan oleh peneliti di luar negeri untuk diaplikasikan dalam menyeleksi materi pemuliaan yang dikembangkan di Indonesia. Namun, penelitian terbaru dalam penentuan salah satu lokus gen pengendali tandan buah keras, yang merupakan salah satu karakter kualitatif penting pada tanaman kelapa sawit, telah dilaporkan oleh Roberdi *et al.* (2015). Fenomena tandan buah keras sering kali menjadi permasalahan utama dalam pemanenan buah kelapa sawit. Pada penelitiannya, Roberdi *et al.* (2015) berhasil mendapatkan marka AFLP yang terkait dengan fenomena tandan buah keras. Dari 22 kombinasi primer AFLP yang polimorfis pada dua jenis tandan buah, yaitu normal dan keras, diperoleh satu kombinasi primer, yaitu EACC/M-CTG yang konsisten muncul pada DNA tanaman tandan buah keras dan tidak ada pita pada DNA tanaman buah normal. Lebih lanjut, analisis sekuen pita spesifik dari lokus ini diketahui mempunyai kemiripan dengan Ty-1 copia retrotransposon. Sekuen tersebut terdistribusi secara merata pada 16 kelompok pautan genom tanaman kelapa sawit. Dengan demikian, melalui penentuan lokus karakter buah keras pada genom kelapa sawit, gen tersebut dapat diisolasi dan dimanfaatkan dalam program pemuliaan kelapa sawit.

PEMETAAN KARAKTER KUANTITATIF (QTL)

Peningkatan mutu suatu sifat kuantitatif tanaman sangat penting dalam program pemuliaan. Melalui studi *pedigree* dalam program pemuliaan konvensional, biasanya pemulia menyilangkan dua tetua tanaman lalu dilakukan proses seleksi secara berkelanjutan hingga diperoleh galur yang paling baik. Galur harapan tersebut akan dievaluasi lebih lanjut dalam suatu rentetan kegiatan pengujian fenotipik di berbagai lokasi di lapangan sehingga memenuhi syarat untuk dilepas sebagai varietas unggul baru. Galur-galur yang terpilih diasumsikan sebagai galur yang memiliki kombinasi alel paling baik dalam mengekspresikan suatu karakter. Program pemuliaan seperti ini membutuhkan tenaga yang banyak, lahan yang luas, dan biaya yang besar. Dengan keterbatasan tersebut, pemulia tanaman membutuhkan metode yang lebih ekonomis dan praktis dalam mengidentifikasi galur-galur harapan sedini mungkin, yaitu seleksi terhadap galur-galur yang mengandung alel QTL yang berkontribusi besar terhadap suatu karakter. Oleh karena itu, pemulia tanaman dan ahli genetika molekuler secara bersama-sama terus berusaha mengembangkan teori dan teknik genetika molekuler agar dapat diaplikasikan dalam identifikasi QTL.

Data yang dibutuhkan dalam identifikasi marka DNA yang terkait dengan QTL ialah data kuantitatif fenotipik setiap individu dalam suatu populasi yang bersegregasi dan data molekuler (genotipik) dari masing-masing individu (misalnya homozigot tetua A, heterozigot, atau homozigot tetua B), sesuai dengan jenis populasi yang digunakan. Dua jenis populasi *mapping* yang sering digunakan dalam pemetaan QTL ialah populasi F_{2*3} (famili F_3 yang berasal dari populasi F_2) dan inbrida rekombinan (RIL). Salah satu kelebihan penggunaan populasi F_{2*3} yaitu efek aditif dan dominan dari aksi gen pada lokus yang spesifik dapat dihitung. Sementara dalam penggunaan populasi inbrida rekombinan, pemulia hanya dapat memprediksi gen aditif karena populasi RIL terdiri atas galur-galur yang homozigot. Untuk pengujian efek lingkungan terhadap QTL di lokasi dan tahun yang berbeda, penggunaan populasi RIL lebih menguntungkan karena materi tanaman yang dikembangkan dengan tipe populasi ini sudah stabil sehingga dapat mendukung percobaan dalam skala besar.

Berbeda dengan pemetaan gen yang mengendalikan karakter kualitatif, pencarian lokasi gen pengendali sifat kuantitatif (QTL) lebih rumit karena kompleksitas gen tersebut. Pemetaan QTL membutuhkan kombinasi antara teknik genetika modern dan analisis statistik yang didukung perangkat lunak yang andal. Data genotipik dan fenotipik sebagai hasil analisis segregasi populasi dianalisis dengan perangkat lunak untuk memperoleh marka DNA yang berasosiasi dengan karakter kuantitatif. Apabila daerah pada kromosom yang bertanggung jawab terhadap suatu karakter kuantitatif sudah

diperoleh, tahapan selanjutnya ialah seleksi galur harapan dalam populasi tersebut yang hanya mengandung alel yang memberikan efek positif terhadap lokus kuantitatif.

Beberapa contoh populasi *mapping* yang digunakan dalam pemetaan QTL yaitu populasi F_2 , haploid ganda, populasi silang balik (*backcross*), galur inbrida rekombinan (RIL), dan silang balik berbasis inbrida rekombinan (BIL) yang dikembangkan untuk menentukan lokus gen yang terkait dengan karakter kuantitatif pada tanaman padi. Meskipun masing-masing jenis populasi memiliki kelebihan dan kekurangan, penentuan populasi *mapping* yang akan digunakan biasanya disesuaikan dengan arah penelitian. Xu *et al.* (2006) menggunakan populasi F_2 untuk memetakan gen yang bertanggung jawab terhadap karakter toleran genangan. Lanceras *et al.* (2004) menggunakan galur-galur haploid ganda untuk memetakan lokus yang terkait dengan karakter toleran kekeringan. Ren *et al.* (2005) memanfaatkan populasi silang balik (BC_2F_2 dan BC_3F_2) dalam memetakan lokus kuantitatif untuk karakter toleransi tanaman padi terhadap salinitas tinggi. Sementara itu, Wissuwa *et al.* (2006) menggunakan galur-galur dari populasi inbrida rekombinan (RIL) dalam memetakan karakter toleransi tanaman terhadap kekurangan seng (Zn). Matsubara *et al.* (2008) menggunakan galur-galur inbrida rekombinan yang dikembangkan secara silang balik (BIL) dalam memetakan lokus kuantitatif yang terkait dengan karakter hari berbunga pada tanaman padi.

Di Indonesia, beberapa lokus pengendali karakter kuantitatif pada tanaman telah ditemukan. Pada tanaman kentang, Tutupary *et al.* (2004) berhasil menentukan lokus gen pengendali karakter ketahanan terhadap penyakit hawar daun kentang pada kromosom 4 yang berasosiasi dengan marka GP180. Marka ini dapat digunakan untuk menentukan gen ketahanan tanaman kentang terhadap *Phytophthora infestans* dalam program perbaikan varietas kentang di Indonesia. Pada tanaman padi, Utami *et al.* (2005) berhasil mengidentifikasi dua lokus gen pengendali karakter tahan blas pada kromosom 2, yaitu gen *Pir2-1(t)* yang berasal dari padi liar *Oryza rufipogon* tahan terhadap ras blas 001 dan gen *Pir2-3(t)* yang berasal dari varietas IR64 yang tahan terhadap ras blas 173. Populasi *mapping* yang digunakan Utami *et al.* (2005) adalah BC_2F_2 dan lokus gen yang mengendalikan karakter tahan terhadap ras blas 001 (*Pir2-1(t)*) ditandai oleh primer RM263, sedangkan lokus gen ketahanan terhadap ras blas 173 ialah RM250. Lestari *et al.* (2011) berhasil menentukan 16 lokus QTL yang bertanggung jawab terhadap ketahanan tanaman padi terhadap penyakit blas dengan menggunakan populasi BC_2F_2 , hasil persilangan antara Way Rarem//Oryzica Llanos5. Lokus gen yang bertanggung jawab terhadap karakter tahan blas yang berasal dari varietas Way Rarem ditemukan pada kromosom 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, dan 11. Di antara lokus yang ditemukan tersebut, marka RM426 yang merupakan marka DNA fungsional yang menyandikan gen kandidat dalam

mekanisme ketahanan (*Oxalate oxidase*) pada kromosom 3 berasosiasi dengan salah satu ras blas Indonesia yang memiliki tingkat virulensi tinggi dan banyak ditemukan pada pertanaman padi gogo, yaitu ras 173. Diketahuinya lokus gen yang berasosiasi dengan karakter ketahanan blas tersebut akan sangat membantu program perakitan varietas padi gogo tahan penyakit blas, antara lain dengan merakit varietas padi yang membawa lebih dari satu gen ketahanan blas atau gen piramida.

Pada era tahun 1990-an, marka DNA yang sering digunakan dalam penentuan lokus yang bertanggung jawab terhadap karakter kuantitatif adalah marka *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Mohan *et al.* 1994; Lin *et al.* 1996; Zhang *et al.* 1996; Huang *et al.* 1997). Karakterisasi QTL pada era ini menghadapi berbagai kesulitan terutama teknis pelaksanaannya membutuhkan waktu relatif lama karena belum tersedianya informasi sekuen genom secara lengkap untuk pencarian lokus kuantitatif. Dengan tersedianya sekuen lengkap dari suatu genom, misalnya pada tanaman padi, sejak sekuen genom tanaman padi selesai dibuat, konstruksi populasi *mapping* dan analisis QTL menjadi lebih efisien dan tenaga juga semakin berkurang. Hal ini membuka peluang pengembangan marka DNA dalam pemetaan QTL, terutama marka DNA yang bersifat kodominan dan pelaksanaannya berbasis PCR. Sebagai contoh adalah marka *cleaved amplified polymorphic site* (CAPS), mikrosatelit atau *simple sequence repeats* (SSR), dan *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang umumnya bersifat kodominan. Marka CAPS adalah marka DNA yang paling sederhana dalam analisis molekuler. Marka ini memiliki tingkat polimorfisme dan heritabilitas yang tinggi (Komori dan Nitta 2005). Kelengkapan informasi sekuen suatu genom tanaman juga memberikan kemudahan bagi peneliti dalam pengembangan marka SSR yang jumlah dan variasinya sangat tinggi dalam suatu genom tanaman. Hal ini makin meningkatkan penggunaan marka SSR dalam identifikasi QTL (McCouch *et al.* 1997; 2002; Gupta dan Varshney 2000) karena tingkat reliabilitas marka SSR lebih baik dibanding marka DNA lainnya, tingkat polimorfismenya tinggi, dan tersebar luas pada seluruh genom tanaman. Marka DNA yang dinilai lebih menjanjikan dalam analisis molekuler pada masa mendatang ialah marka SNP, yang tersedia paling banyak pada setiap spesies (Nasu *et al.* 2002; Rafalski 2002).

Sejalan dengan pengembangan marka DNA, jenis populasi yang paling cocok dan lebih menjanjikan dalam pemetaan QTL terus dikembangkan oleh pemulia tanaman. Usaha ini dilakukan untuk mengantisipasi kelemahan penggunaan populasi *mapping* utama seperti F_2 dan RIL di mana hanya QTL yang menunjukkan efek yang luas saja (*major QTL*) yang dapat dideteksi melalui populasi tersebut. QTL yang kontribusinya kecil (*minor QTL*) dan QTL yang berinteraksi dengan lokus lain (*epistatic QTL*) bisa saja tidak teridentifikasi pada populasi tersebut (Yano dan Sasaki 1997).

Pembedaan QTL mayor dan minor didasarkan pada besaran kontribusi suatu QTL terhadap nilai fenotipik, yang ditentukan dari nilai koefisien determinan (R^2) yang diperoleh dari analisis regresi antara marka DNA dan karakter kuantitatif. Apabila nilai $R^2 > 10\%$ maka QTL digolongkan sebagai QTL yang bersifat major, sebaliknya QTL dengan nilai $R^2 < 10\%$ dikategorikan sebagai QTL minor. QTL major lebih stabil pada setiap lingkungan, sementara QTL minor sangat sensitif terhadap lingkungan, khususnya QTL yang terkait dengan ketahanan terhadap suatu penyakit tanaman (Li *et al.* 2001; Lindhout 2002; Pilet-Nayel *et al.* 2002).

QTL epistasis dan QTL minor umumnya dapat dideteksi pada progeni yang berasal dari populasi silang balik pada generasi lebih lanjut (Lin *et al.* 2000; Yamamoto *et al.* 2000; Lin *et al.* 2003). Meskipun melalui *primary mapping population* lokasi QTL dapat diidentifikasi, pengembangan progeni isogenik (NILs) masih diperlukan dan merupakan salah satu syarat penting agar pemetaan dan kloning QTL bisa dilakukan.

Pengembangan materi tanaman seperti tersebut di atas membutuhkan tenaga yang besar dan waktu yang lebih lama sehingga sering kali menjadi hambatan dalam melakukan kloning QTL (*map-based cloning of QTL*). Oleh karena itu, pemulia tanaman dan ahli genetika mengembangkan populasi yang lebih sesuai dalam pemetaan QTL. Sebagai contoh adalah *chromosome segment substitution lines* (CSSLs), *introgression lines* (ILs), dan *recombinant chromosome substitution lines* (RCSLs) yang sangat efektif untuk mendeteksi QTL. Identifikasi QTL dengan menggunakan galur-galur yang dikembangkan dengan teknik CSSL lebih efektif (Kubo *et al.* 2002; Ebitani *et al.* 2005; Ando *et al.* 2008; Liu *et al.* 2008; Zhao *et al.* 2009) dan dapat membantu pengembangan suatu kultivar yang superior dalam program pemuliaan tanaman. Pada galur-galur CSSL, masing-masing galur akan memiliki kromosom yang memiliki latar belakang genetik seperti tetua resipienya dan hanya segmen tertentu yang secara spesifik digantikan oleh satu segmen kromosom yang berasal dari tetua donornya. Dengan demikian, setiap galur CSSL akan tersubstitusi pada segmen kromosom yang berbeda satu sama lainnya dan semua galur yang tersubstitusi akan mencakup keseluruhan latar belakang genetik dari tetua resipien.

ANALISIS STATISTIK PEMETAAN GENETIK

Metode yang umum dipakai dalam analisis keterkaitan antara data fenotipik dan data genotipik dalam identifikasi QTL yaitu analisis statistik sederhana (*single-marker analysis*), *simple interval mapping* (SIM), dan *composite interval mapping* (CIM) (Tanksley 1993; Liu 1998). *Single-marker analysis* merupakan metode statistik yang paling sederhana untuk mendeteksi QTL yang berasosiasi

dengan satu marka DNA. Pada metode ini, analisis statistik yang digunakan meliputi uji t (*T-test*), anova, dan regresi liner. Namun, uji regresi lebih sering dipakai pada metode ini karena nilai koefisien determinasi (R^2) dari marka tersebut menunjukkan variasi fenotipik dari QTL yang terpaut dengan marka DNA. Perangkat lunak yang umum dipakai dalam *single marker analysis* adalah QGene dan MapManager QTX (Nelson 1997; Manly *et al.* 2001).

Identifikasi QTL menggunakan metode SIM, secara statistik lebih akurat daripada *single-marker analysis* (Lander dan Dotstein 1989; Liu 1998) karena posisi QTL bisa ditentukan dalam interval dua marka DNA yang letaknya berdekatan (Lander dan Dotstein 1989). Perangkat lunak yang biasa dipakai dalam identifikasi QTL dengan menggunakan metode SIM yaitu MapMaker/QTL (Lincoln *et al.* 1993) dan QGene (Nelson 1997). Metode CIM mengombinasikan metode *interval mapping* dengan regresi linear (Jansen 1993; Jansen dan Stam 1994; Zeng 1994). Identifikasi QTL menggunakan analisis CIM memberikan hasil yang lebih tepat dan akurat serta lebih efektif dibandingkan metode *single-marker analysis* dan SIM, terutama karena kemampuan metode ini dalam menganalisis interaksi antar-QTL (epistasis). Perangkat lunak yang biasa dipakai untuk deteksi QTL dengan menggunakan metode CIM adalah QTL Cartographer (Basten *et al.* 2001; Wang *et al.* 2001), MapManager QTX (Manly *et al.* 2001), dan PLABQTL (Utz dan Melchinger 1996).

Pada metode *single-marker analysis*, hasil analisis QTL biasanya berupa tabel yang menunjukkan marka yang terpaut dengan QTL, kromosom atau *linkage group*, nilai probabilitas, dan persentase variasi fenotipik sebagai kontribusi dari QTL (R^2). Sementara analisis statistik menggunakan metode SIM dan CIM menghasilkan nilai LOD (*logarithmic of odds*) atau *likelihood ratio statistic* (LRS). Kedua nilai ini dapat dikonversi satu sama lain berdasarkan penghitungan berikut, $LRS = 4,6 \times LOD$ (Liu 1998). Posisi yang paling tepat dari QTL dalam suatu peta keterpautan ditentukan berdasarkan nilai LOD yang paling tinggi, biasanya ditunjukkan oleh grafik di mana sumbu X adalah marka DNA dalam kromosom atau *linkage group* dan nilai statistiknya berada pada sumbu Y. Prinsip dan metode statistik dalam analisis marka DNA yang berasosiasi dengan lokus kuantitatif bisa dipelajari lebih rinci pada manual yang tersedia pada setiap perangkat lunak.

PERSPEKTIF

Penentuan lokus suatu gen dalam kromosom dengan menggunakan marka DNA perlu dilakukan sebelum marka DNA tersebut digunakan sebagai alat bantu seleksi untuk mendapatkan individu yang memiliki karakter yang diinginkan. Ketersediaan genom total suatu spesies tanaman mempermudah dan mempersingkat upaya

menemukan gen target. Identifikasi suatu gen yang diinginkan menjadi titik masuk untuk mengetahui dasar informasi dari karakter yang dikontrol (Fasseti *et al.* 2011; Mainali *et al.* 2014). Informasi penting tentang mutasi dan struktur gen sudah selayaknya diinvestigasi secara total dan dipublikasi.

Penggunaan marka molekuler sangat menjanjikan dalam program pemuliaan tanaman, terutama dalam membantu penandaan gen-gen yang mengontrol karakter yang diinginkan, seperti produktivitas dan ketahanan terhadap hama dan penyakit tanaman serta kondisi lingkungan yang ekstrem. Marka DNA juga sangat penting dalam meningkatkan efisiensi seleksi untuk karakter penting melalui MAS. Dengan demikian ke depan, pemanfaatan marka molekuler yang telah diketahui fungsionalnya dan *functional genomics* akan membantu pemulia dalam pengembangan varietas tanaman. Sekuensing genom skala besar dan bioinformatik terkait menjadi alat dalam mengakselerasi analisis struktur genom dan fungsinya yang secara otomatis mempermudah identifikasi gen-gen penting dalam kromosom (Pichersky dan Gerats 2011).

Dengan mengetahui konsep dasar pencarian lokasi gen dalam kromosom, peluang untuk memanfaatkan teknologi berbasis marka DNA di Indonesia, khususnya pada institusi yang bergerak dalam penelitian berbasis bioteknologi pertanian akan makin terbuka lebar. Ribuan koleksi plasma nutfah pertanian yang tersedia perlu dieksplotasi secara terarah sehingga sumber-sumber genetik yang potensial dapat diidentifikasi, diklon, dan dimanfaatkan dalam program perbaikan suatu varietas. Tersedianya berbagai fasilitas penunjang penelitian biologi molekuler, termasuk alat *next generation sequencing* (NGS) akan makin membuka peluang dan mempercepat upaya mengoleksi dan memanfaatkan gen-gen yang berasal dari plasma nutfah Indonesia.

KESIMPULAN

Penentuan lokus gen dalam kromosom sangat penting dalam kegiatan pemuliaan tanaman. Ketersediaan peta genetik dengan tingkat resolusi tinggi akan mempermudah penentuan lokus suatu gen dalam kromosom.

Penentuan lokus suatu gen harus didukung oleh ketersediaan peta genetik yang dibentuk dari marka DNA polimorfis yang mampu membedakan tetua dari populasi persilangan. Tetua-tetua persilangan yang dipilih harus berbeda secara genetik atau ekstrem dalam satu atau lebih karakter target yang telah ditentukan.

Marka DNA yang digunakan dalam penentuan lokus gen pengendali suatu karakter tanaman harus tersedia dalam jumlah yang cukup dan tersebar secara merata pada kromosom suatu tanaman. Penentuan lokus gen pengendali suatu karakter tanaman membutuhkan pengetahuan serta keahlian sumber daya manusia dalam analisis statistik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, S. and S. Tanksley. 1993. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7980–7984.
- Ando, T., T. Yamamoto, T. Shimizu, X.F. Ma, A. Shomura, Y. Takeuchi, S.Y. Lin, and M. Yano. 2008. Genetic dissection and pyramiding of quantitative traits for panicle architecture by using chromosomal segment substitution lines in rice. *Theor. Appl. Genet.* 116: 881–890.
- Basten, C., B. Weir, and Z. Zeng. 2001. QTL Cartographer Version 1.15. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. pp. 10–158.
- Collard, B., M. Jahufer, J. Brouwer, and E. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.* 3: 43–52.
- Ebitani, T., Y. Takeuchi, Y. Nonoue, T. Yamamoto, K. Takeuchi, and M. Yano. 2005. Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of indica rice cultivar ‘Kasalath’ in a genetic background of japonica elite cultivar ‘Koshihikari’. *Breed. Sci.* 55: 65–73.
- Fassetti, F., O. Leone, L. Palopoli, S.R. Rombo, and A. Saiardi. 2011. IP6K gene identification in plant genomes by tag searching. *BMC Proc.* 5 (Suppl 2): S1.
- Ferreira, A., M.F. da Silva, L. Silva, and C.D. Cruz. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.* 29: 187–192.
- Gupta, P. and R. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.
- Gupta, P.K., R.K. Varshney, and M. Prasad. 2002. Molecular markers: principles and methodology, *Molecular Techniques in Crop Improvement*. Springer. Van Godewijkstraat, GX Dordrecht, Netherlands. pp. 9–54.
- Hartl, D.L. 1988. *A Primer of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hartl, D. and E. Jones. 2001. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
- He, P., J. Li, X. Zheng, L. Shen, C. Lu, Y. Chen, and L. Zhu. 2001. Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Sci.* 41: 1240–1246.
- Henry, R.J. 2001. *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CABI.
- Huang, N., A. Parco, T. Mew, G. Magpantay, S. McCouch, E. Guiderdoni, J. Xu, P. Subudhi, E.R. Angeles, and G.S. Khush. 1997. RFLP mapping of isozymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in a doubled haploid rice population. *Mol. Breed.* 3: 105–113.
- Jansen, R.C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205–211.
- Jansen, R.C. and P. Stam. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136: 1447–1455.
- Jones, N., H. Ougham, and H. Thomas. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137: 165–177.
- Komori, T. and N. Nitta. 2005. Utilization of the CAPS/dCAPS method to convert rice SNPs into PCR-based markers. *Breed. Sci.* 55: 93–98.
- Kubo, T., Y. Aida, K. Nakamura, H. Tsunematsu, K. Doi, and A. Yoshimura. 2002. Reciprocal chromosome segment substitution series derived from japonica and indica cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Breed. Sci.* 52: 319–325.
- Lanceras, J.C., G. Pantuwan, B. Jongdee, and T. Toojinda. 2004. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. *Plant Physiol.* 135: 384–399.
- Lander, E.S. and Dotstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- Lestari, P., K.R. Trijatmiko, Reflinur, A. Warsun, Tasliah, I. Ona, C.V. Cruz, and M. Bustamam. 2011. Mapping quantitative trait loci conferring blast resistance in upland Indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Crop Sci. Biotechnol.* 14: 57–63.
- Li, Z., L. Jakkula, R. Hussey, J. Tamulonis, and H. Boerma. 2001. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theor. Appl. Genet.* 103: 1167–1173.
- Lin, H.X., H.R. Qian, J.Y. Zhuang, J. Lu, S.K. Min, Z.M. Xiong, N. Huang, and K.L. Zheng. 1996. RFLP mapping of QTLs for yield and related characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 92: 920–927.
- Lin, H., T. Yamamoto, T. Sasaki, and M. Yano. 2000. Characterization and detection of epistatic interactions of 3 QTLs, Hd1, Hd2, and Hd3, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. *Theor. Appl. Genet.* 101: 1021–1028.
- Lin, H., Z.W. Liang, T. Sasaki, and M. Yano. 2003. Fine mapping and characterization of quantitative trait loci Hd4 and Hd5 controlling heading date in rice. *Breed. Sci.* 53: 51–59.
- Lincoln, S., M. Daly, and E. Lander. 1993. Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual. Whitehead Institute for Biometrical Research, Cambridge, Mass.
- Lindhout, P. 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* 124: 217–226.
- Liu, B.H. 1998. *Statistical Genomics: Linkage Mapping, Mapping, and QTL Analysis*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Liu, G., Z. Zhang, H. Zhu, F. Zhao, X. Ding, R. Zeng, W. Li, and G. Zhang. 2008. Detection of QTLs with additive effects and additive-by-environment interaction effects on panicle number in rice (*Oryza sativa* L.) with single-segment substitution lines. *Theor. Appl. Genet.* 116: 923–931.
- Mainali, H.R., P. Chapman, and S. Dhaubhadel. 2014. Genome-wide analysis of Cyclophilin gene family soybean (*Glycine max*). *BMC Plant Biol.* 14: 282.
- Manly, K.F., Jr R.H. Cudmore, and J.M. Meer. 2001. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930–932.
- Matsubara, K., I. Kono, K. Hor, Y. Nonoue, N. Ono, A. Shomura, T. Mizubayashi, S. Yamamoto, U. Yamanouchi, and K. Shirasawa. 2008. Novel QTLs for photoperiodic flowering revealed by using reciprocal backcross inbred lines from crosses between japonica rice cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 117: 935–945.
- McCouch, S.R. and R.W. Doerge. 1995. QTL mapping in rice. *Trends in Genetics* 11: 482–487.
- McCouch, S.R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii, and M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35: 89–99.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, and Y. Xing. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9: 199–207.
- Michelmore, R.W., I. Paran, and R. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 9828–9832.
- Mohan, M., S. Nair, J. Bentur, U.P. Rao, and J. Bennett. 1994. RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm2* gene that confers

- resistance to biotype 1 of gall midge (*Orseolia oryzae*). *Theor. Appl. Genet.* 87: 782–788.
- Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T. Krishna, M. Yano, C. Bhatia, and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol. Breed.* 3: 87–103.
- Nasu, S., J. Suzuki, R. Ohta, K. Hasegawa, R. Yui, N. Kitazawa, L. Monna, and Y. Minobe. 2002. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Res.* 9: 163–171.
- Nelson, J.C. 1997. QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Mol. Breed.* 3: 239–245.
- Paterson, A.H. 1996. Making genetic maps. In A.H. Paterson (Ed.) *Genome Mapping in Plants*. Academic Press, San Diego, California, Austin, Texas. pp. 23–39.
- Paterson, A.H., J.E. Bowers, M.D. Burow, X. Draye, C.G. Elsik, C.X. Jiang, C.S. Katsar, T.H. Lan, Y.R. Lin, and R. Ming. 2000. Comparative genomics of plant chromosomes. *The Plant Cell Online* 12: 1523–1539.
- Pichersky, E. and T. Gerats. 2011. The plant genome: an evolutionary perspective on structure and function. *The Plant J.* 66: 1–3.
- Pilet-Nayel, M., F. Muehlbauer, R. McGee, J. Kraft, A. Baranger, and C. Coyne. 2002. Quantitative trait loci for partial resistance to *Aphanomyces* root rot in pea. *Theor. Appl. Genet.* 106: 28–39.
- Poehlman, J.M. and D.A. Sleper. 1995. *Breeding Field Crops*. Iowa State University Press, Iowa.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 94–100.
- Ren, Z.H., J.P. Gao, L.G. Li, X.L. Cai, W. Huang, D.Y. Chao, M.Z. Zhu, Z.Y. Wang, S. Luan, and H.X. Lin. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* 37: 1141–1146.
- Roberdi, H. Aswidinnoor, A. Setiawan, Sutrisno, M.B. Pabendon, dan M. Azrai. 2010. Keterpautan 23 marka mikrosatelit pada kromosom 6 dan 7 dengan karakter ketahanan populasi jagung terhadap penyakit bulai (*Peronosclerospora maydis*). *Jurnal Agro Biogen* 6: 10–17.
- Roberdi, Sobir, S. Yahya, N.T. Mathius, and T. Liwang. 2015. Identification of gene related to hard bunch phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Jurnal Agronomi Indonesia* 43: 147–152.
- Sanjaya, L., G.A. Wattimena, E. Guhardja, M. Yusuf, H. Aswidinnoor, dan P. Stam. 2002. Pemetaan QTL untuk sifat ketahanan terhadap penyakit antraknose pada *Capsicum* spp. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 7: 43–54.
- Semagn, K., A. Bjørnstad, and M. Ndjiondjop. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 2569–2587.
- Setiawan, A. 2001. Pemetaan marker AFLP untuk membuat peta genetik bit gula. *Buletin Agronomi* 29: 40–49.
- Tanksley, S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27: 205–233.
- Tasma, I.M., A. Warsun, D. Satyawan, S.J. Pardal, and Slamet. 2011. Genetic mapping of SSR markers in eight soybean chromosomes based on F₂ population B3462 x B3293. *Jurnal Agro Biogen* 7: 69–75.
- Tutupary, J.M., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, dan Muladno. 2004. Pemetaan gen resistensi lapang terhadap penyakit hawar daun kentang pada populasi F₁ *Solanum tuberosum* (SH2988) x *Solanum microdonum* (MCD167) potato progenies. *Buletin Agronomi* 32: 9–15.
- Utami, D.W., S. Moeljopawiro, H. Aswidinnoor, A. Setiawan, dan E. Guhardja. 2005. Analisis lokus kuantitatif sifat ketahanan penyakit blas pada populasi antarspesies IR64 dan *Oryza rufipogon*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 10: 7–14.
- Utz, H. and A. Melchinger. 1996. PLABQTL: a program for composite interval mapping of QTL. *J. Quant. Trait Loci* 2: 1–5.
- Wang, G. and A. Paterson. 1994. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 88: 355–361.
- Wang, S., C.J. Basten, P. Gaffney, and Z.B. Zeng. 2001. Windows QTL Cartographer version 2.5. North Carolina State University, Bioinformatics Research Center, Raleigh.
- Wissuwa, M., A.M. Ismail, and S. Yanagihara. 2006. Effects of zinc deficiency on rice growth and genetic factors contributing to tolerance. *Plant Physiol.* 142: 731–741.
- Xu, K., X. Xu, T. Fukao, P. Canlas, R. Maghirang-Rodriguez, S. Heuer, A.M. Ismail, J. Bailey-Serres, P.C. Ronald, and D.J. Mackill. 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705–708.
- Yamamoto, T., H. Lin, T. Sasaki, and M. Yano. 2000. Identification of heading date quantitative trait locus Hd6 and characterization of its epistatic interactions with Hd2 in rice using advanced backcross progeny. *Genetics* 154: 885–891.
- Yano, M. and T. Sasaki. 1997. Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Mol. Biol.* 35: 145–153.
- Yim, Y.S., G.L. Davis, N.A. Duru, T.A. Musket, E.W. Linton, J.W. Messing, M.D. McMullen, C.A. Soderlund, M.L. Polacco, and J.M. Gardiner. 2002. Characterization of three maize bacterial artificial chromosome libraries toward anchoring of the physical map to the genetic map using high-density bacterial artificial chromosome filter hybridization. *Plant Physiol.* 130: 1686–1696.
- Young, N.D. 1994. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers, DNA-based markers in plants. Springer. Van Godewijkstraat, GX Dordrecht, Netherlands. pp. 39–57.
- Zeng, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457–1468.
- Zhang, G.Q., E. Angeles, M. Abenes, G. Khush, and N. Huang. 1996. RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene xa-13 in rice. *Theor. Appl. Genet.* 93: 65–70.
- Zhao, L., H. Zhou, L. Lu, L. Liu, X. Li, Y. Lin, and S. Yu. 2009. Identification of quantitative trait loci controlling rice mature seed culturability using chromosomal segment substitution lines. *Plant Cell Rep.* 28: 247–256.